

PENGARUH UKURAN FOLIKEL TERHADAP KUALITAS OOSIT SAPI PERANAKAN ONGOLE DAN KEMAMPUAN MATURASI *IN VITRO*Diah Tri Widayati¹**INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ukuran folikel terhadap kualitas oosit sapi Peranakan Ongole dan kemampuan maturasi *in vitro*. Ovaria diambil dari rumah potong hewan segera sesudah sapi disembelih dan dibawa ke laboratorium dalam NaCl 0,9%, 31-34°C. Oosit diaspirasi dari folikel yang berukuran 2,00-4,50 mm dan 4,51-7,00 mm dengan menggunakan siring 5 ml dengan jarum 19G yang telah diisi 1 ml *Dulbecco's phosphate buffered saline* (D-PBS) + 3% *new born calf serum* (NBCS). Pencarian oosit dilakukan dibawah mikroskop stereo. Oosit dicuci dengan D-PBS + 3% NBCS sebanyak dua kali kemudian dicuci dengan media maturasi yang terdiri dari *hepes-buffered tissue culture medium* 199 (TCM 199) dengan *Earle's salt* yang ditambah dengan *penisilin G* 100 IU/ml dan *streptomisin sulfat* 10mg/ml + 5% NBCS. Oosit dipisahkan kedalam dua kelompok, yaitu kelompok folikel kecil (diameter 2,00-4,50 mm) dan kelompok folikel besar (diameter 4,51-7,00 mm). Maturasi oosit *in vitro* dilakukan dengan cara meletakkan oosit dalam 100µl media maturasi yang ditutup dengan minyak mineral dan dimasukkan dalam inkubator CO₂ pada suhu 39°C dan kadar CO₂ 5% selama 22 jam. Variabel yang diamati meliputi kualitas oosit dan angka maturasi. Data dianalisis secara statistik menggunakan *chi-square*. Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata pada kualitas oosit. Kualitas oosit untuk kelompok folikel kecil dan folikel besar masing-masing adalah kelas I (kompak) 45,14% dan 58,53%, kelas II (dikelilingi sel-sel kumulus yang tidak utuh) adalah 34,72% dan 18,18%, kelas III (*denuded*) 18,06% dan 11,36% serta kelas IV (dikelilingi fibrin) adalah 2,08% dan 11,93%. Hasil penelitian juga menunjukkan angka maturasi kelompok folikel kecil dan kelompok folikel besar secara statistik berbeda nyata. Angka maturasi untuk masing-masing kelompok folikel adalah 79,16% dan 86,93%. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ukuran folikel berpengaruh terhadap kualitas oosit sapi Peranakan Ongole dan kemampuan maturasi *in vitro*.

(Kata Kunci: Ukuran Folikel, Kualitas Oosit, Sapi Peranakan Ongole, Maturasi *In Vitro*).

Buletin Peternakan 23 (3) : 94 - 102, 1999

EFFECTS OF FOLLICLE SIZE ON ONGOLE CROSS-BRED OOCYTES QUALITY AND ABILITY TO MATURE *IN VITRO*

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the effect of follicle size on Ongole cross-bred oocytes quality and ability to mature *in vitro*. Ovaries were collected from slaughterhouse as soon as the cow was slaughtered and transported to the laboratory in NaCl 0.9% at 31-34°C. Aspiration were carried out from follicles with diameter 2.00 up to 4.50 mm and 4.51 up to 7.00 mm using disposable syringe with 19G needle which had filled 1 ml Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) + 3% new born calf serum (NBCS). Searching of oocytes were done under stereo microscope. Oocytes were washed twice using D-PBS + 3% NBCS followed by maturation medium consist of hepes-buffered tissue culture medium 199 with Earle's salt was added penicillin G 100 IU/ml and streptomycin sulfate 10mg/ml + 5% NBCS. Oocytes were divided into 2 groups, small follicle group (2.00-4.50 mm) and big follicle group (4.51-7.00 mm). *In vitro* maturation was done by placing oocytes into drop of TCM 199 + 5% NBCS and covered by mineral oil, then incubated under 39°C and 5% CO₂ for 22 hours. The variables measured involved oocytes quality and maturation rate. The data were analyzed by Chi-square test. Result of the present research showed significant differences on oocytes quality. Oocytes quality of each groups follicle were grade I (compact) 45.14% and 58.53%, grade II (uncompact) 34.72% and 18.18%, grade III (denuded) 18.06% and 11.36%, grade IV (expanded) 2.08% and 11.93%. Result of the present research also showed significant differences on maturation rate. Maturation rate from each groups of follicle were 79.16% and 86.93%. Based on the results could be concluded that follicle size affected on Ongole cross-bred oocytes and ability to mature *in vitro*.

(Key Words: Follicle Size, Oocytes Quality, Ongole Cross-bred, *In Vitro* Maturation).

Pendahuluan

Fertilisasi *in vitro* merupakan cara yang praktis untuk memperoleh embrio dalam jumlah banyak dan murah untuk penelitian atau ditransfer ke resipien. Dengan teknik fertilisasi *in vitro* oosit dari sapi betina yang mengalami gangguan patologi seperti *cystic ovary* masih mampu menghasilkan embrio (Lazzari dan Galli, 1993). Oosit yang diperoleh dari folikel sapi merupakan oosit yang belum masak, artinya belum mencapai tingkat maturasi atau pemasakan sitoplasma yang siap untuk difertilisasi. Untuk itu oosit harus dimaturation dahulu sebelum dilakukan fertilisasi *in vitro*. Maturasi oosit mempunyai fungsi yang sangat penting bagi keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Maturasi ini meliputi maturasi nukleus dan sitoplasma oosit. Maturasi oosit merupakan peristiwa yang berhubungan dengan inisiasi perusakan vesikel

germinal (*germinal vesicle break down*) dan selesainya pembelahan meiosis yang pertama (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987). Ada beberapa kompo-nen yang esensial untuk indikasi maturasi, yaitu antara lain terputusnya membran nukleus yang disebut *germinal vesicle breakdown* (GVBD), ekstrusi *polar body* pertama (PB) dan ekspansi sel-sel kumulus (Tounson, 1992; Gordon 1994). Ekspansi sel-sel kumulus bertepatan dengan terjadinya pembelahan meiosis (Eppig dan O'Brien, 1996). Kemam-puan oosit untuk maturasi *in vitro* setelah diambil dari vesikular folikel untuk maturasi *in vitro* sangat berpengaruh terhadap kemampuan oosit tersebut untuk difertilisasi *in vitro* (Shea *et al.*, 1976). Menurut Lonergan *et al.* (1991) maturasi oosit *in vitro* dipengaruhi oleh ukuran folikel. Disamping itu maturasi oosit juga dipengaruhi oleh kondisi seluler dan keutuhan sitoplasma (Leibfried dan First, 1979) Oosit

yang diaspirasi dari folikel yang berukuran besar akan mempunyai kualitas oosit dan kemampuan maturasi *in vitro* yang lebih baik daripada yang berasal folikel kecil, karena oosit sudah mengalami perkembangan sehingga mempunyai *micro-environment* yang lebih baik (Lonergan *et al.*, 1991).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ukuran folikel terhadap kalitas oosit sapi Peranakan Ongole dan kemampuan maturasi *in vitro*.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan ovaria sapi Peranakan Ongole (PO) yang berasal rumah potong hewan sebagai sumber oosit. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan garam fisiologis untuk mencuci dan membawa ovaria ke laboratorium, *tissue culture medium* 199 (TCM 199), *Dulbecco's phosphate buffered saline* (D-PBS), Na piruvat, *penicillin G*, *streptomycin sulfate*, *new born calf serum* (NBCS), minyak mineral, aquabides steril.

Seluruh prosedur yang dipakai dalam penelitian ini mengikuti prosedur dari Suzuki (1992) yang disitasi oleh Putro (1993).

a. Koleksi ovaria

Ovaria diambil dari rumah potong hewan setelah sapi disembelih, kemudian dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% yang telah diberi *penicillin G* (100 IU/ml) dan *streptomycin sulfate* (10 mg/ml) dan ditempatkan ke dalam termos yang berisi larutan yang sama dengan suhu 31-34°C. Ovaria dibawa ke laboratorium dalam waktu tidak lebih dari 3 jam.

b. Aspirasi dan pencarian oosit

Oosit diaspirasi dari folikel yang berukuran 2,00-4,50 mm dan 4,51-7,00 mm dengan menggunakan siring 5 ml dan jarum 19 G yang berisi D-PBS + 3% NBCS. Cairan yang diperoleh dari folikel ditampung dalam tabung yang terpisah, kemudian dilakukan pencarian oosit. Pencarian dan evaluasi oosit

dilakukan dengan menuangkan cairan folikel pada cawan petri 35 mm steril yang dasarnya sudah diberi garis kotak-kotak (0,5 x 0,5 cm) di bawah mikroskop stereo dengan perbesaran 10x. Klasifikasi oosit yang dipakai untuk seleksi mengikuti Gordon (1994) dan Sugawara (1995) adalah sebagai berikut (Gambar 1-4):

- Kelas 1 = terdapat beberapa lapisan sel kumulus utuh dan kompak, ooplasma rata tidak bergranula (kompak).
- Kelas 2 = lapisan sel kumulus tidak utuh (minimal ½ keliling oosit), ooplasma rata.
- Kelas 3 = oosit gundul tanpa lapisan sel kumulus (*denuded*).
- Kelas 4 = oosit dikelilingi oleh fibrin yang menyerupai sarang laba-laba (*expanded*).

c. Maturasi oosit

Oosit yang diperoleh dari folikel tersebut dipisahkan kedalam 2 (dua) kelompok perlakuan, yaitu kelompok folikel kecil (2,00-4,50 mm) dan kelompok folikel besar (4,51-7,00 mm). Masing-masing kelompok oosit diletakkan dalam media maturasi TCM 199 (25mM Hepes TCM 199 dengan garam Earle's) yang telah diberi antibiotik (*penicillin G* 100 IU/ml dan *streptomycin sulfate* 10 mg/ml) dan 5% NBCS, kemudian diletakkan pada media maturasi yang ditutup dengan minyak mineral dan dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ pada suhu 39°C, kadar CO₂ 5% selama 22 jam.

d. Analisis hasil

Variabel yang diamati meliputi kualitas oosit dan persentase oosit yang masak (*maturations rate*). Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji *chi-square*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan jumlah dan kualitas aspirasi oosit dari kedua macam folikel tercantum pada tabel 1.

Tabel 1. Jumlah dan kualitas oosit setelah aspirasi

	Ukuran folikel (mm)	
	2,00-4,50	4,51-7,00
Jumlah oosit yang diperoleh	183	193
Jumlah oosit yang dapat dipakai	144 ^a	176 ^b
Kelas I	65 ^a	103 ^b
	(45,14%)	(58,53%)
Kelas II	50 ^a	32 ^b
	(34,72%)	(18,18%)
Kelas III	26 ^a	20 ^b
	(18,06%)	(11,36%)
Kelas IV	3 ^a	21 ^b
	(2,08%)	(11,93%)

^{a,b} Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata pada kualitas oosit yang diaspirasi dari folikel kecil (2,00-4,50 mm) dan folikel besar (4,51-7,00 mm). Jumlah oosit yang diperoleh dalam penelitian ini dari folikel kecil sebanyak 183 buah, sedangkan dari folikel yang besar 196 buah. Persentase oosit yang dapat dipakai untuk penelitian dari folikel kecil 78,69% (144 buah), sedangkan yang berasal dari folikel besar adalah 89,79% (176 buah). Tidak semua oosit yang diperoleh pada saat aspirasi dapat digunakan untuk penelitian, karena ada oosit yang mengalami kerusakan seluler (sobek pada sitoplasma dan oosit pecah), sehingga bila digunakan dalam penelitian tidak baik. Menurut Leibfried dan First (1979) kondisi seluler sangat mempengaruhi kualitas oosit yang nantinya akan berpengaruh pada kemampuan maturasi oosit.

Penelitian juga menunjukkan oosit yang berasal dari folikel besar mempunyai kualitas yang lebih baik daripada yang berasal dari folikel kecil. Persentase oosit dengan kriteria kelas I lebih besar pada oosit yang diaspirasi dari folikel besar (58,53%) daripada folikel kecil (45,14%). Persentase oosit

dengan kriteria kelas III lebih besar pada oosit yang diaspirasi dari folikel kecil (18,06%) daripada folikel besar (11,36%). Hal ini menunjukkan bahwa kualitas oosit yang berasal dari folikel besar lebih baik daripada folikel kecil. Hal ini sesuai dengan pendapat Lonergan *et al.* (1991) yang menyatakan bahwa ukuran folikel mempengaruhi kualitas oosit, oosit dengan kualitas yang baik akan diperoleh dari folikel besar.

Persentase oosit yang masak setelah maturasi *in vitro* tercantum pada tabel 2., sedangkan gambar oosit sebelum dan sesudah dimatursasikan tercantum pada gambar 5 dan 6. Penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata pada angka maturasi antara oosit yang berasal dari folikel besar dan folikel kecil. Persentase oosit yang masak dari folikel kecil adalah 79,16%, sedangkan dari folikel besar 86,93%. Hal ini disebabkan pada folikel yang berukuran besar oositnya sudah mengalami perkembangan sehingga mempunyai *microenvironment* yang dapat meningkatkan kualitas oosit sehingga akan menghasilkan kemampuan maturasi dan fertilisasi *in vitro* yang lebih baik (Lonergan *et al.*, 1991).

Tabel 2. Persentase oosit yang masak setelah maturasi *in vitro*

	Ukuran folikel (mm)	
	2,00-4,50	4,51-7,00
Jumlah oosit yang diperoleh	144	176
Jumlah oosit yang dapat dipakai	114 ^a	153 ^b
	(79,16%)	(86,93%)
Kelas I	65 ^a	102 ^b
	(45,14%)	(57,95%)
Kelas II	46 ^a	30 ^b
	(31,94%)	(17,05%)
Kelas III	0	0
	(0%)	(0%)
Kelas IV	3 ^a	21 ^b
	(2,08%)	(11,93%)

^{a,b} Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Hasil penelitian juga menunjukkan angka maturasi tertinggi diperoleh dari oosit dengan kualitas kelas I (kompak), sedangkan angka maturasi terendah diperoleh dari oosit kualitas III (*denuded*) dari masing-masing kelompok folikel (tabel 2). Hal ini sesuai dengan pendapat Gordon (1990) yang menyatakan bahwa oosit yang memiliki banyak lapisan sel-sel kumulus menunjukkan keberhasilan maturasi yang tinggi. Oosit dengan kelas lainnya tidak memberikan hasil yang baik setelah maturasi *in vitro*. Hal ini berkaitan dengan luas bagian yang tertutup sel-sel kumulus yang memegang peranan penting dalam proses maturasi. Gordon (1990) mengemukakan bahwa kriteria oosit yang diterima untuk dimatursasikan *in vitro* ditentukan oleh luas bagian yang tertutup sel-sel kumulus. Hal ini berkaitan dengan fungsi sel-sel kumulus, yaitu menyediakan nutrisi untuk oosit. Sel-sel kumulus secara tidak langsung memproduksi faktor seluler seperti EGF (*epidermal growth factor*) yang berperan penting pada ekspansi sel-sel kumulus (Lu *et al.*, 1987). Metabolisme bersama antara oosit dan sel-sel kumulus menghasilkan nutrisi yang berperan penting selama proses maturasi. Komunikasi inter-seluler melalui *gap junction* antara oosit dan

sel-sel kumulus yang mengelilinginya penting untuk pertumbuhan oosit secara *in vitro*, tanpa adanya *gap junction* oosit tumbuh sangat kecil dan setelah beberapa hari dalam kultur akan mengalami nekrosis, karena secara normal oosit tergantung pada sel-sel granulosa untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya (Wassarman, 1988). *Gap junction* ini merupakan jalan lintas nutrisi untuk oosit (Sutovsky *et al.*, 1993).

Kesimpulan

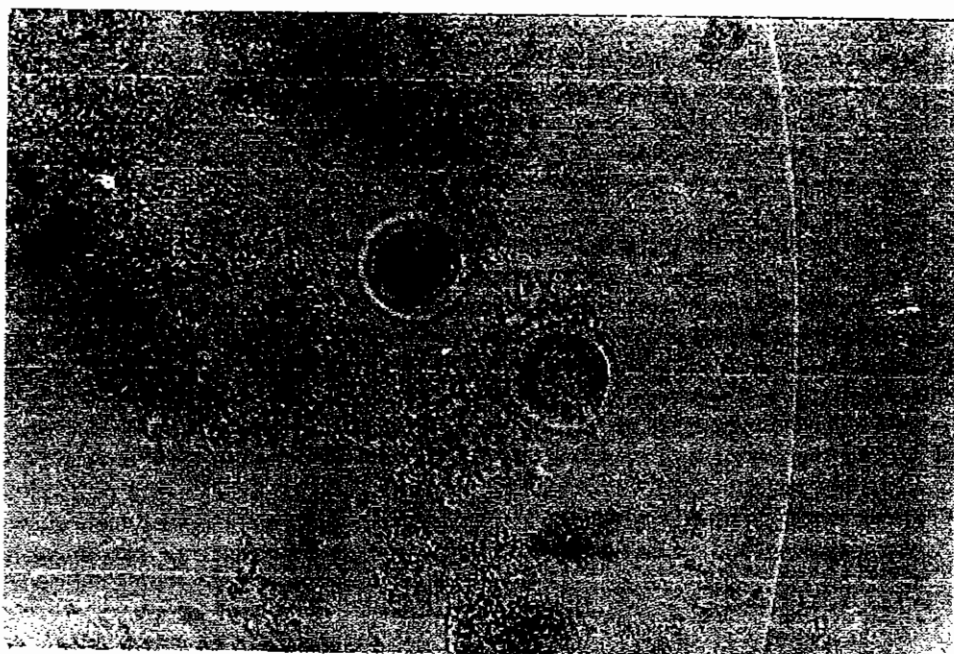
Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ukuran folikel mempengaruhi kualitas oosit sapi Peranakan Ongole dan kemampuan maturasi *in vitro*. Kualitas oosit sapi Peranakan Ongole dan kemampuan maturasi *in vitro* yang berasal dari folikel yang besar lebih baik daripada yang berasal dari folikel kecil.

Ucapan Terima Kasih

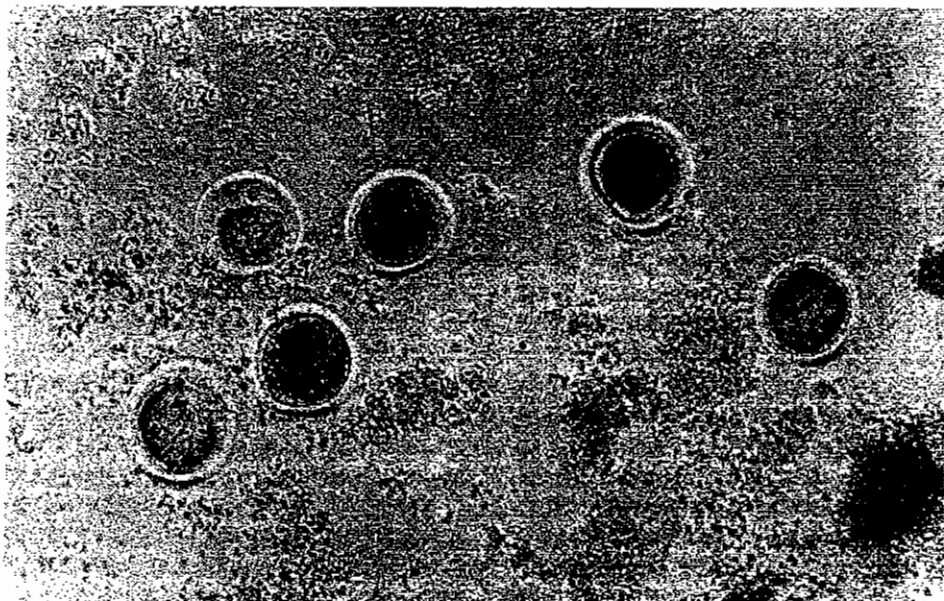
Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Tim DPP Fakultas Peternakan UGM 1997/1998 dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas dana yang disalurkan melalui TMPD sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian ini.



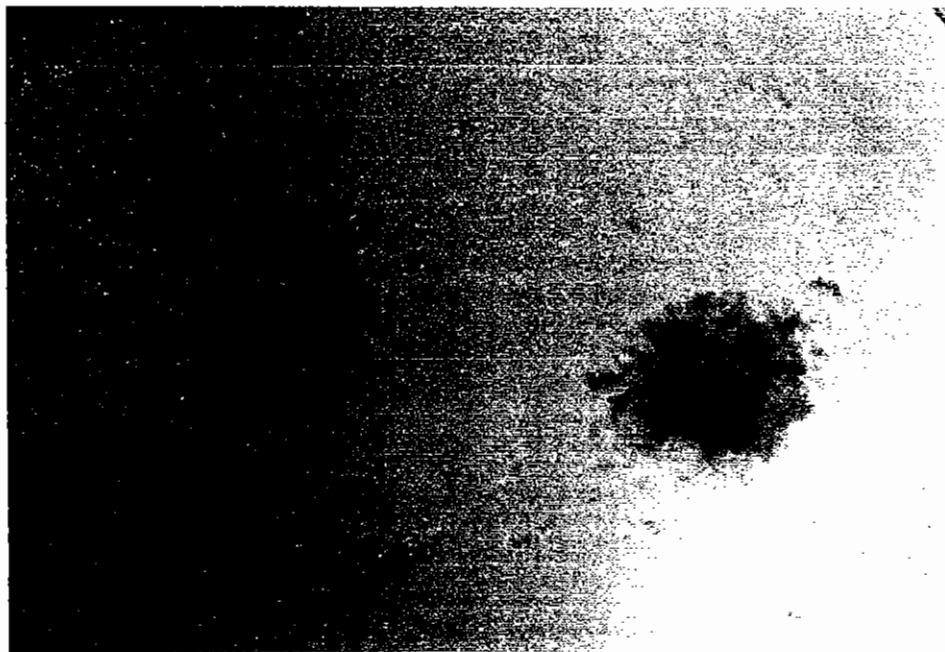
Gambar 1. Oosit sapi kelas I tampak dikelilingi oleh sel-sel kumulus yang berlapis-lapis, perbesaran 20x, o = oosit; k = lapisan sel-sel kumulus



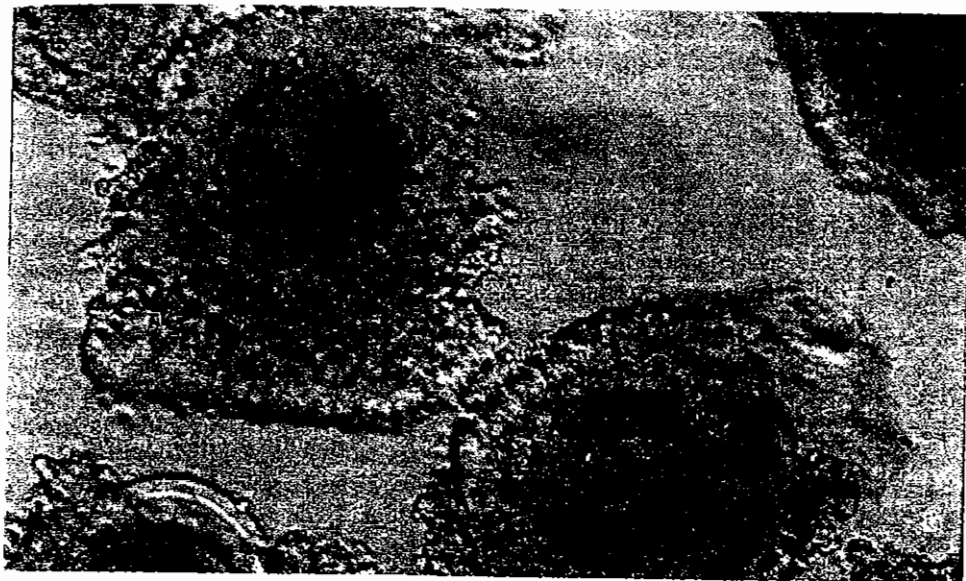
Gambar 2. Oosit sapi kelas II tampak dikelilingi oleh sel-sel kumulus yang tidak utuh, perbesaran 20x, o = oosit; k = lapisan sel-sel kumulus



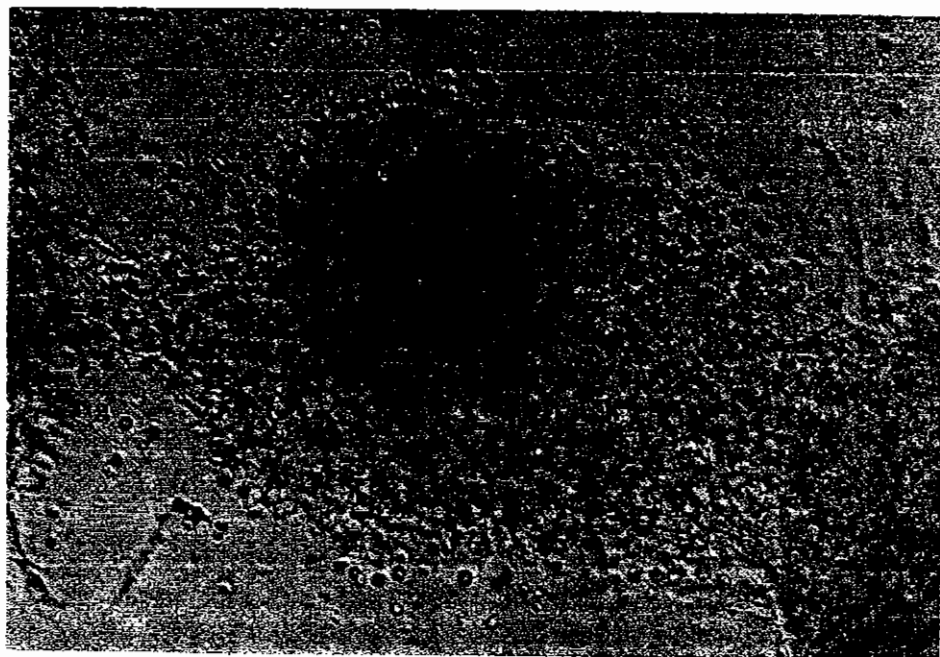
Gambar 3. Oosit sapi kelas III tanpa dikelilingi oleh sel-sel kumulus (gundul)
perbesaran 20x, o = oosit; k = lapisan sel-sel kumulus



Gambar 4. Oosit sapi kelas IV tampak dikelilingi oleh fibrin yang menyerupai sarang laba-laba, perbesaran 20x, o = oosit; f = fibrin



Gambar 5. Oosit sapi sebelum dimatursikan, sel-sel kumulus tampak rapat mengelilingi oosit, perbesaran 40x, o = oosit; k = lapisan sel-sel kumulus



Gambar 6. Oosit sapi setelah dimatursikan *in vitro*, tampak ekspansi sel-sel kumulus yang merenggang, perbesaran 40x, o = oosit; k = lapisan sel-sel kumulus

Daftar Pustaka

- Eppig, J. J. and M. J. O'Brien. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54: 197-207.
- Gordon, I. 1990. In vitro maturation (IVM) and fertilization (IFV) of cattle ova. *Embryos Transfer Newsletter*, Vol. 8:3.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Lazzari, G. dan C. Galli. 1993. In vitro embryo production from valuable cows slaughtered for production failure or terminal illness. *Theriogenology*, 39: 256 (Abstract)
- Leibfried, L. dan First, N. L. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48 : 77 - 86.
- Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Critser, W. H. Eyestone, D. L. Northey, and L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 36:376-383.
- Lonergan, P., H. Sharif, P. Monaghan, H. Wahid, M. Gallagher, and I. Gordon. 1991. The effect of follicle size on type of bovine oocytes obtained for in vitro maturation. *Proceedings of Seventh Meeting of The European Embryo Transfer Association.*
- Lu, K. H., Gordon, I. dan H. McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Veterinary Record*, September:12
- Putro, P.P. 1993. *Petunjuk laboratorium fertilisasi in vitro*. Pusat Anta Universitas-bioteknologi UGM Yogyakarta.
- Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Bedirian and R. D. Baker. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809-812.
- Sutovsky, P., J. E. Flechon, B. Flexon, J. Motlik, N. Peynot, P. Chesna, dan Y. Heyman, 1993. Dynamic changes of gap junction and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.* 49:1277-1287.
- Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 28:125-137.
- Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In: *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. Edited by Erns Knobil and Jimmy D. Neil. Raven Press, New York.